

HPLC法测定降糖消脂片中盐酸小檗碱的含量^Δ

任 焯*,徐 辉,葛争艳,金 龙,刘建勋,郭宇洁*(中国中医科学院西苑医院基础医学研究所/中药药理北京市重点实验室,北京 100091)

中图分类号 R284.1;R927.2 文献标志码 A 文章编号 1001-0408(2015)18-2530-03

DOI 10.6039/j.issn.1001-0408.2015.18.28

摘要 目的:建立测定降糖消脂片中盐酸小檗碱含量的方法。方法:采用高效液相色谱法。色谱柱为Symmetry C₁₈,流动相为乙腈-0.05 mol/L磷酸二氢钠溶液(用磷酸调节pH至3.0)(24:76, V/V),流速为1.0 ml/min,检测波长为345 nm,柱温为室温,进样量为10 μl。结果:盐酸小檗碱进样量在0.522~4.698 μg范围内与其峰面积呈良好的线性关系($r=0.999\ 9$);精密性、稳定性、重复性试验的RSD≤0.72%;平均加样回收率为97.79%,RSD为2.09%($n=6$)。结论:该方法简便、准确、灵敏、重复性好,适用于降糖消脂片中盐酸小檗碱的含量测定。

关键词 降糖消脂片;盐酸小檗碱;高效液相色谱法;含量测定

Content Determination of Berberine Hydrochloride in Jiangtang Xiaozhi Tablets by HPLC

REN Ye, XU Hui, GE Zheng-yan, JIN Long, LIU Jian-xun, GUO Yu-jie (Institute of Basic Medicine, Xiyuan Hospital of China Academy of Chinese Medical Sciences / Beijing Key Laboratory of Pharmacology of Chinese Materia Medica, Beijing 100091, China)

ABSTRACT OBJECTIVE: To establish a method for the content determination of berberine hydrochloride in the Jiangtang xiaozhi tablets. METHODS: HPLC was conducted with the Symmetry C₁₈ column. The mobile phase was acetonitrile-0.05 mol/L sodium dihydrogen phosphate (pH adjusted to 3.0 using phosphoric acid) (24:76, V/V) at the flow rate of 1.0 ml/min. The detection wavelength was 345 nm, the column temperature was room temperature and injection volume was 10 μl. RESULTS: The linear range of berberine hydrochloride was 0.522-4.698 μg ($r=0.999\ 9$); RSDs of precision, stability and reproducibility tests were no more than 0.72%; the average recovery was 97.79% (RSD=2.09%, $n=6$). CONCLUSIONS: The method is simple, accurate, sensitive and reproducible, and can be used for the content determination of berberine hydrochloride.

KEYWORDS Jiangtang xiaozhi tablets; Berberine hydrochloride; HPLC; Content determination

降糖消脂片是根据我院内分泌专家结合多年临床经验形成处方并运用现代制药技术研制而成的中药制剂,全方由黄连、女贞子、荔枝核等药味组成,具有益气养阴、行气通络的功效。黄连为毛茛科植物黄连 *Coptis chinensis* Franch.、三角叶黄连 *Coptis deltoidea* C.Y.Cheng et Hsiao 或云连 *Coptis teeta* Wall.的干燥根茎,具有清热燥湿、泻火解毒的功效^[1],入药已有两千多年的历史,《神农本草经》中列为上品^[2]。黄连含多种异喹啉类生物碱,其中盐酸小檗碱又名黄连素,为黄连的主要成分,含量约为5%~8%^[3],临床常作为清热解毒、抗肠道细菌感染类药物应用。现代药理学研究证实,盐酸小檗碱具有降血糖、降血脂等药理作用,从而被广泛地应用于2型糖尿病、高脂血症的治疗^[4-5]。

盐酸小檗碱的含量测定方法有紫外分光光度法^[6]、薄层扫描法^[7]、红外光谱法^[8]、高效液相色谱(HPLC)法^[9-11]、毛细管电泳法^[12-13]等。HPLC法具有分离效率高、定量准确、

应用范围广等特点,目前已经成为多数实验室的常用分析方法。本试验主要对HPLC法测定降糖消脂片中盐酸小檗碱的含量进行研究,以为该制剂的生产和质量控制提供依据。

1 材料

1.1 仪器

Waters HPLC仪,包括515型泵、996型二极管阵列检测器、717型自动进样器、Millennium³²色谱工作站(美国Waters公司);KQ5200型超声波清洗器(昆山市超声仪器有限公司);AE240型电子天平(瑞士Mettler-Toledo公司)。

1.2 药品与试剂

盐酸小檗碱对照品(中国食品药品检定研究院,批号:110713-200208,纯度:98%);乙腈、甲醇为色谱纯,水为超纯水,其余试剂均为分析纯;降糖消脂片(中国中医科学院西苑医院基础医学研究所自制,批号:130911、131013、131014、131015,规格:每片0.8 g);黄连、女贞子、荔枝核药材(均购自河北安国市神农中药饮片有限公司,批号:1101011、1208011、1203012)经中国中医科学院西苑医院郭宇洁研究员鉴定,分别为毛茛科植物黄连 *Coptis chinensis* Franch.的干燥根茎,木犀科植物女贞 *Ligustrum lucidum* Ait.的干燥成熟果实,无患子科植物荔枝 *Litchi chinensis* Sonn.的干燥成熟种子。

^Δ 基金项目:“重大新药创制”科技重大专项课题(No.2010ZX091-02-213)

* 主管药师,硕士。研究方向:中药制剂及其相关研究。电话:010-62835610。E-mail:125161659@qq.com

通信作者:研究员,博士。研究方向:中药制剂及其相关研究。电话:010-62835615。E-mail:guoyujie121@sina.com

2 方法与结果

2.1 色谱条件^[6-9]

色谱柱: Symmetry C₁₈ (150 mm×3.9 mm, 5 μm); 填充剂: 十八烷基硅烷键合硅胶; 流动相: 乙腈-0.05 mol/L 磷酸二氢钠溶液(用磷酸调节pH至3.0)(24:76, V/V); 流速: 1.0 ml/min; 检测波长: 345 nm; 柱温: 室温; 进样量: 10 μl。理论板数按盐酸小檗碱峰计算应不低于5 000, 分离度>1.5。

2.2 溶液的制备

2.2.1 对照品溶液 精密称取盐酸小檗碱对照品适量, 加甲醇制成每1 ml含盐酸小檗碱0.2 mg的溶液, 摇匀, 即得。

2.2.2 供试品溶液 取本品20片, 除去包衣, 精密称定, 研细, 取0.2 g, 精密称定, 精密加入甲醇20 ml, 称定质量, 超声(功率: 250 W, 频率: 40 kHz)处理40 min, 放冷, 再次称定质量, 用甲醇补足减失的质量, 摇匀, 用微孔滤膜(0.45 μm)滤过, 取续滤液, 即得。

2.2.3 阴性对照溶液 按照处方比例, 取缺少黄连的其余药材, 按降糖消脂片制备工艺制成阴性样品, 再按“2.2.2”项下方法制成阴性对照溶液。

2.3 阴性干扰试验

按“2.1”项下色谱条件, 精密吸取“2.2”项下对照品溶液、供试品溶液、阴性对照溶液各10 μl进样分析, 结果盐酸小檗碱在10 min左右出现特征吸收峰, 阴性对照溶液在此保留时间未显色谱峰, 对测定无干扰, 详见图1。

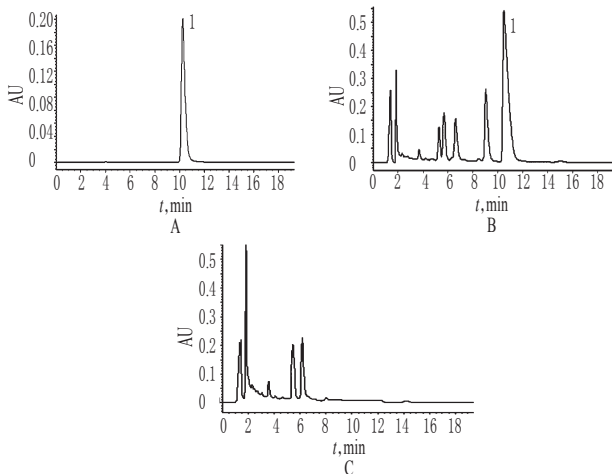


图1 高效液相色谱图

A. 对照品; B. 供试品; C. 阴性对照; 1. 盐酸小檗碱

Fig 1 HPLC chromatograms

A. reference substance; B. testing sample; C. negative sample; 1. berberine hydrochloride

2.4 线性关系考察

精密称取盐酸小檗碱2.61 mg, 置于10 ml量瓶中, 加入甲醇至刻度, 摇匀, 配制成每1 ml含0.261 mg的线性试验溶液, 进样体积分别为2、4、6、8、10、14、18 μl, 注入HPLC仪, 测定峰面积。以盐酸小檗碱的进样量(x, μg)为横坐标、峰面积(y)为纵坐标, 进行线性回归, 得回归方程为 $y=3\ 531\ 159.59x+601\ 011.35$ ($r=0.999\ 9, n=7$)。结果表明, 盐酸小檗碱进样量在0.522~4.698 μg范围内与其峰面积呈良好的线性关系。

2.5 精密度试验

精密吸取“2.2.1”项下对照品溶液10 μl, 按“2.1”项下色谱条件连续进样6次, 记录峰面积。结果, RSD为0.41%, 表明仪

器精密度良好。

2.6 稳定性试验

取同一供试品(批号: 130911)溶液10 μl, 分别于放置0、1、2、4、6、8、10、18、20、24 h时按“2.1”项下色谱条件进样测定, 记录峰面积。结果, RSD为0.72%, 表明供试品溶液在24 h内稳定性良好。

2.7 重复性试验

取同一批样品(批号: 130911)6份, 分别按“2.2.2”项下方法制备供试品溶液, 再按“2.1”项下色谱条件进样测定并计算含量。结果, 盐酸小檗碱平均含量为20.93 mg/g, RSD为0.64%, 表明该方法重复性较好。

2.8 加样回收率试验

精密称取已知盐酸小檗碱含量(20.93 mg/g)的样品(批号: 130911)适量, 共6份, 分别加入0.53 mg/ml的盐酸小檗碱对照品溶液4 ml, 再分别精密加入甲醇16 ml, 按“2.2.2”项下方法制备供试品溶液, 再按“2.1”项下色谱条件进样测定, 记录峰面积, 并计算加样回收率, 结果详见表1。

表1 加样回收率试验结果(n=6)

Tab 1 Results of recovery test(n=6)

| 称样量, g | 样品含量, mg | 加入量, mg | 测得量, mg | 加样回收率, % | 平均加样回收率, % | RSD, % |
|---------|----------|---------|---------|----------|------------|--------|
| 0.100 1 | 2.095 1 | 2.120 0 | 4.164 2 | 97.60 | | |
| 0.109 7 | 2.296 0 | 2.120 0 | 4.323 1 | 95.62 | | |
| 0.102 8 | 2.151 6 | 2.120 0 | 4.229 1 | 98.00 | 97.79 | 2.09 |
| 0.101 3 | 2.120 2 | 2.120 0 | 4.179 8 | 97.15 | | |
| 0.102 3 | 2.141 1 | 2.120 0 | 4.295 1 | 101.60 | | |
| 0.107 4 | 2.247 9 | 2.120 0 | 4.299 4 | 96.77 | | |

2.9 样品含量测定

取3批降糖消脂片样品(批号: 131013、131014、131015), 按“2.2.2”项下方法制备供试品溶液, 再按“2.1”项下色谱条件进样测定, 记录峰面积, 并计算含量, 结果详见表2。

表2 样品含量测定结果(n=3)

Tab 2 Results of content determination of samples(n=3)

| 批号 | 含量, mg/g | 平均含量, mg/g | RSD, % |
|--------|----------|------------|--------|
| 131013 | 20.874 5 | 20.959 2 | 0.52 |
| | 21.082 1 | | |
| | 20.928 9 | | |
| 131014 | 21.123 4 | 21.201 5 | 0.38 |
| | 21.284 5 | | |
| | 21.196 7 | | |
| 131015 | 19.185 6 | 19.211 5 | 0.51 |
| | 19.129 7 | | |
| | 19.319 3 | | |

3 讨论

本试验曾对冷浸、超声、加热回流提取方法进行比较, 发现冷浸提取盐酸小檗碱含量较低, 超声和加热回流提取所得含量接近且较高, 又因为超声提取时间短、耗能低、操作简单, 故采用超声提取方法。考察超声提取时间10、20、30、40、50 min, 结果随着超声时间的增加盐酸小檗碱提取含量提高, 但50 min时含量有所降低, 表明超声40 min时盐酸小檗碱提取比较完全。供试品溶液制备分别比较了2%盐酸-甲醇(1:1, V/V)、95%乙醇、甲醇作为提取溶剂, 测定结果显示甲醇作为溶剂时提取最完全。

采用紫外分光光度计, 在200~400 nm波长范围内对盐酸小檗碱对照品进行扫描, 发现在230、265、345 nm波长处均有

牛蒡子配方颗粒的质量标准研究^Δ

甄兰敏*,李军山,姜海,陈钟,李振江(神威药业集团有限公司,石家庄 051430)

中图分类号 R284.1;R927.2 文献标志码 A 文章编号 1001-0408(2015)18-2532-03
DOI 10.6039/j.issn.1001-0408.2015.18.29

摘要 目的:建立牛蒡子配方颗粒的质量标准。方法:采用薄层色谱法对牛蒡子配方颗粒进行定性鉴别;采用高效液相色谱法对牛蒡子配方颗粒中的牛蒡苷进行含量测定。色谱柱为Dionex C₁₈,流动相为甲醇-水(40:60, V/V),流速为1.0 ml/min,检测波长为280 nm,柱温为30 ℃,进样量为10 μl。结果:薄层色谱图中牛蒡子配方颗粒在与牛蒡子对照药材相应位置上呈现相同颜色的斑点。牛蒡苷进样量在0.5~12.5 μg范围内与其峰面积呈良好的线性关系($r=0.999\ 8$);精密性、稳定性、重复性试验的RSD≤1.0%;平均加样回收率为98.41%(RSD=0.81%, $n=9$)。结论:本方法可行、重复性好,能有效地控制牛蒡子配方颗粒的质量。

关键词 牛蒡子;配方颗粒;薄层色谱法;高效液相色谱法;质量标准

Study on the Quality Standard of *Fructus arctii* Concentrated Granules

ZHEN Lan-min, LI Jun-shan, JIANG Hai, CHEN Zhong, LI Zhen-jiang (Shineway Pharmaceutical Group Co., Ltd., Shijiazhuang 051430, China)

ABSTRACT OBJECTIVE: To establish the quality standard of *Fructus arctii* concentrated granules. METHODS: TLC was conducted for the qualitative identification and HPLC was used for the content determination of arctiin in *F. arctii* concentrated granules. The determination was performed on Dionex C₁₈ column with mobile phase consisted of methanol-water(40:60, V/V) at the flow rate of 1.0 ml/min. The detection wavelength was set at 280 nm, and the column temperature was 30 ℃. The samples size was 10 μl. RESULTS: TLC spectrum showed that the spots of *F. arctii* concentrated granules and arctiin reference medicinal material had the same color; the linear range of arctiin was 0.5-12.5 μg($r=0.999\ 8$) with the average recovery of 98.41% (RSD=0.81%, $n=9$). The RSDs of precision, stability, repeatability tests were no more than 1.0%. CONCLUSIONS: The method is feasible and reproducible, and can effectively control the quality of *F. arctii* concentrated granules.

KEYWORDS *Fructus arctii*; Concentrated granules; TLC; HPLC; Quality standard

较强吸收峰,其中345 nm波长下溶剂峰干扰和背景干扰均较小,故选择此波长为测定波长。HPLC法测定盐酸小檗碱含量的试验中流动相多采用磷酸或磷酸盐缓冲溶液提高分离效果。本试验采用乙腈-0.05 mol/L磷酸二氢钠溶液(用磷酸调节pH至3.0)(24:76, V/V)为流动相,盐酸小檗碱分离效果较好,阴性对照无干扰,专属性强。

综上所述,本方法简便、准确、灵敏、重复性好,适用于降糖消脂片中盐酸小檗碱的含量测定。

参考文献

- [1] 国家药典委员会.中华人民共和国药典:一部[S].2010年版.北京:中国医药科技出版社,2010:285-286.
- [2] 吴普,孙星衍,孙冯翼.神农本草经[M].北京:人民卫生出版社,1982:26.
- [3] 田代华.实用中药辞典[M].北京:人民卫生出版社,2005:1 715-1 724.
- [4] 张洁,王立琴.黄连素治疗糖尿病的研究进展[J].中西医结合心脑血管病杂志,2003,1(3):160.
- [5] 左茹,曹雪滨,张文生.黄连素药理作用研究进展[J].环球

中医药,2014,7(7):568.

- [6] 刘婷,梁宗锁,丁美海,等.黄连叶片中盐酸小檗碱提取工艺研究[J].西北林学院学报,2010,25(6):144.
- [7] 姚志凌,李明辉.薄层扫描法测定连翘冲剂中盐酸小檗碱的含量[J].中医学报,2010,25(5):930.
- [8] 周旻,王天志,叶利明,等.近红外漫反射光谱法测定川产黄柏中小檗碱含量[J].光谱学与光谱分析,2007,27(8):1 527.
- [9] 谢东,路玫.反相高效液相色谱法同时测定双黄连片中黄芩苷和盐酸小檗碱的含量[J].药物分析杂志,2008,28(5):782.
- [10] 叶秀金,宋粉云.HPLC测定清肺抑火丸中盐酸小檗碱的含量[J].中国实验方剂学杂志,2011,17(3):90.
- [11] 王静,秦伟.HPLC法测定康妇膜中盐酸小檗碱的含量[J].中国药房,2011,22(35):3 309.
- [12] 刘训红,宋建平,李俊松,等.非水毛细管电泳测定黄柏片中4种生物碱的含量[J].中成药,2010,32(11):1 928.
- [13] 李金,张明辉,房娟娟,等.毛细管电泳法测定一清软胶囊中盐酸小檗碱的含量[J].中国现代药物应用,2010,4(22):19.

^Δ基金项目:国家中医药管理局中医药科学技术研究专项课题(No.国中医药科2013ZX07);河北省科技计划项目(No.14272504D)

*工程师。研究方向:中药研发与注册。电话:0311-88030066。
E-mail:zhenlanmin2011@126.com

(收稿日期:2014-09-17 修回日期:2014-12-30)

(编辑:余庆华)